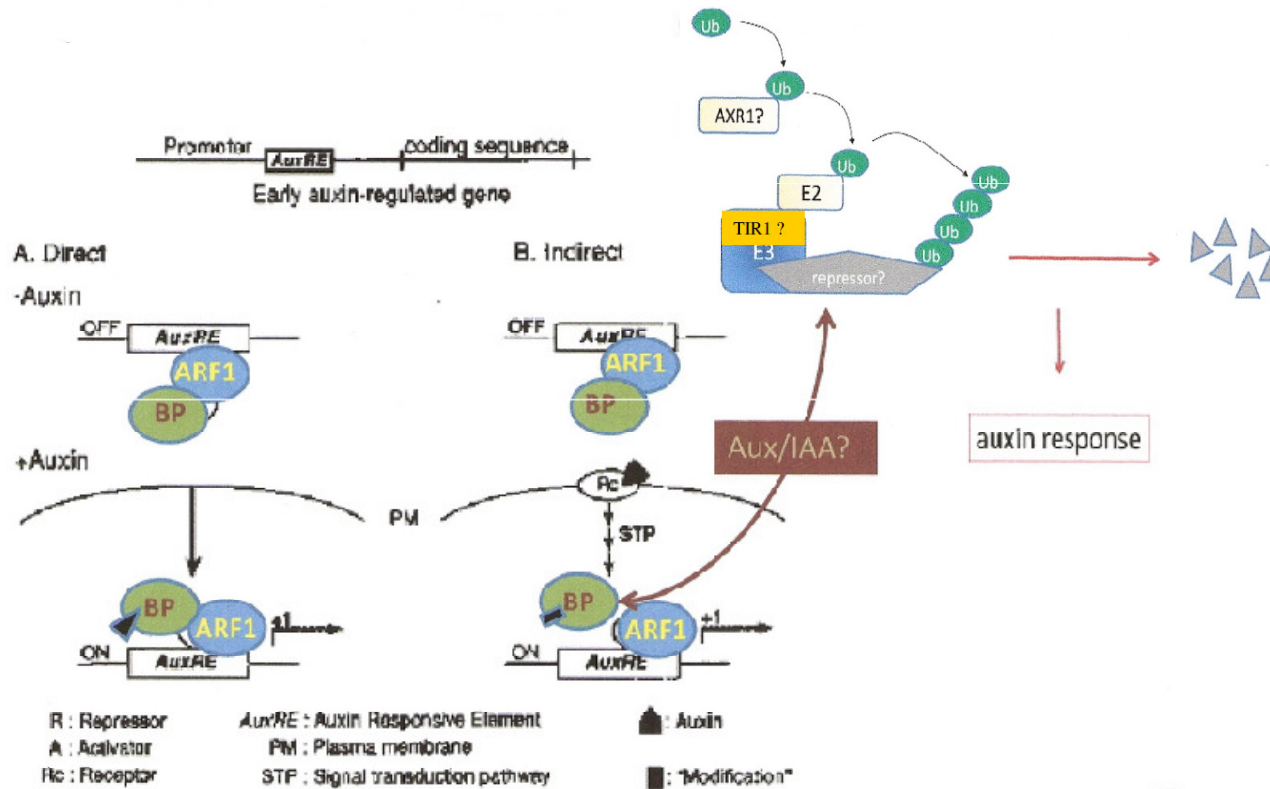
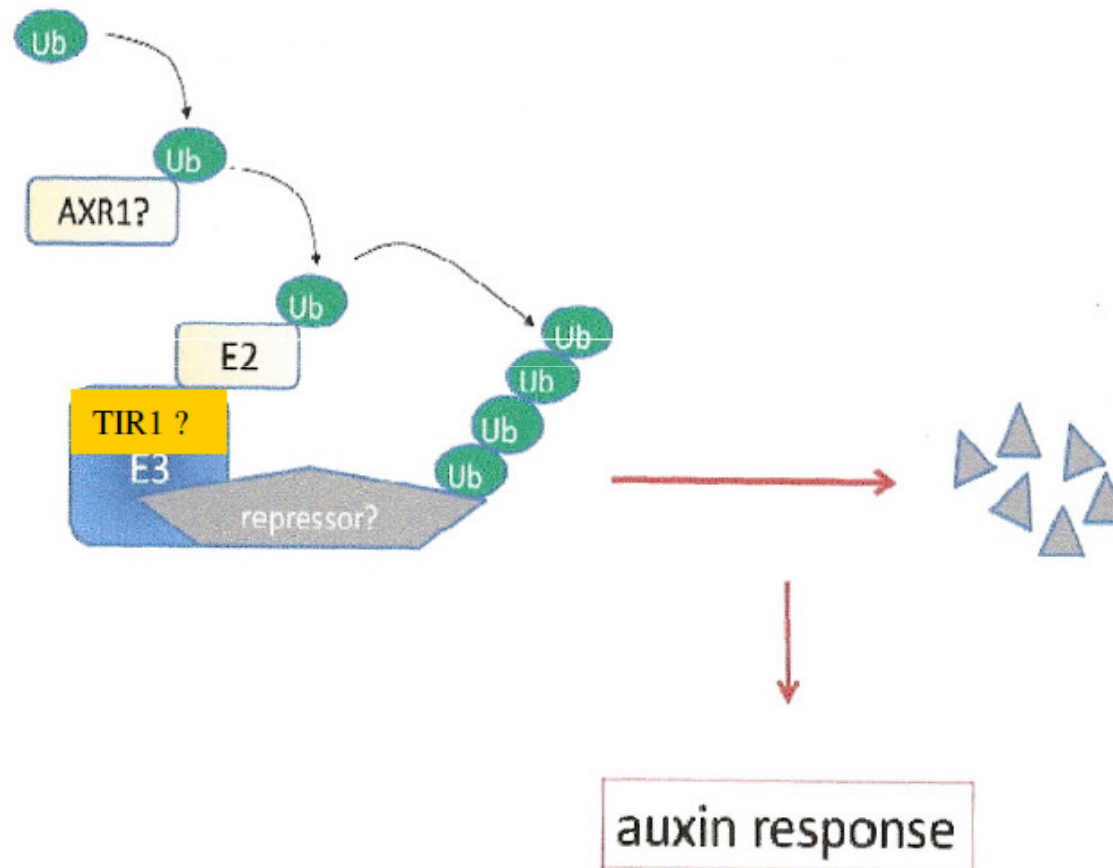


Hypothetische Modelle



Hypothetische Modelle



Das Paper

Identification of an SCF ubiquitin–ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*

William M. Gray,^{1,4} J. Carlos del Pozo,^{1,4} Loni Walker,¹ Lawrence Hobbie,^{1,5} Eddy Risseuw,² Travis Banks,² William L. Crosby,² Ming Yang,³ Hong Ma,³ and Mark Estelle^{1,4,6}

Inhalt:

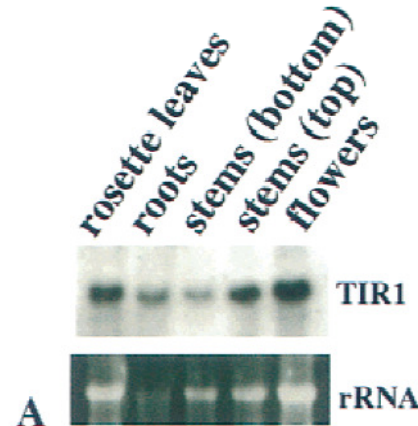
Dieses Paper:

- Zeigt, dass TIR1 in Arabidopsis mit Skp1 (wie ASK1 und ASK2) und dem Cullin AtCUL1 einen Komplex formt, der SCF^{TIR1} genannt wird
- Weist nach, dass der SCF-Komplex weitere Komponenten neben ASK1 als Voraussetzung für die Auxinantwort benötigt

→ Auxinsignale werden von SCF^{TIR1} vermittelt

Expression von TIR1

- Annahme: AXR1 und TIR1 spielen im selben pathway eine Rolle
- Über Northern Blot dedektierte man *TIR1* in Wurzeln, Spross, Blatt und Blüten
- Expression von *TIR1* bestimmen:
Promoter GUS (β -Glucuronidase) wird eingeführt
→ Genaktivierung sichtbar
→ hohe *TIR1:GUS* Expression in Wurzelapikalmeristemen, wachsenden Kotyledonen und Hypokotylen



Expression von *TIR1*

Starke *TIR1:GUS* Expression in:

- Apikalmeristem von Spross (D) und Wurzel (C)
- Blüte, speziell Narbe und Fillament (H)

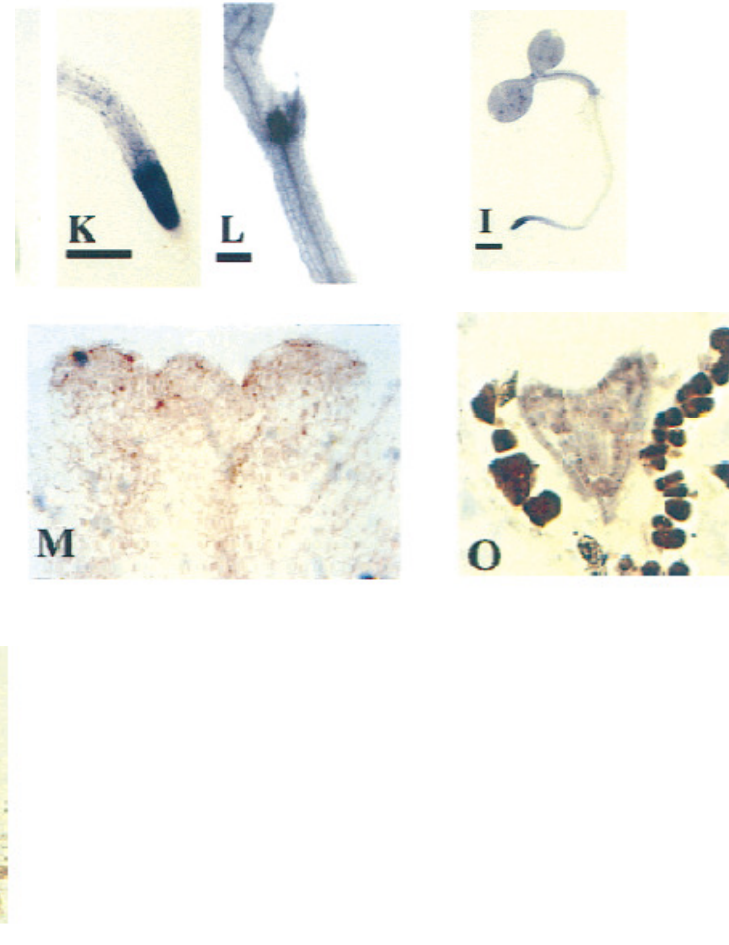


Expression von *TIR1*

In situ RNA-Hybridisierung:

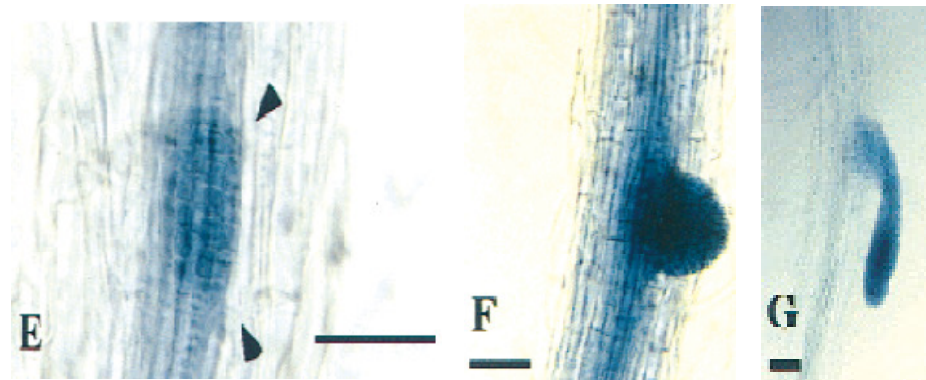
- Nachweis im Gewebe
 - ähnlich Northern Blot
 - Nachweis von *TIR1* mRNA
- Hohe Konzentration von *TIR1*-RNA in Meristemen

Negativ Kontrolle mit sense Sonde:



TIR1 Funktionen in lateralen Wurzeln

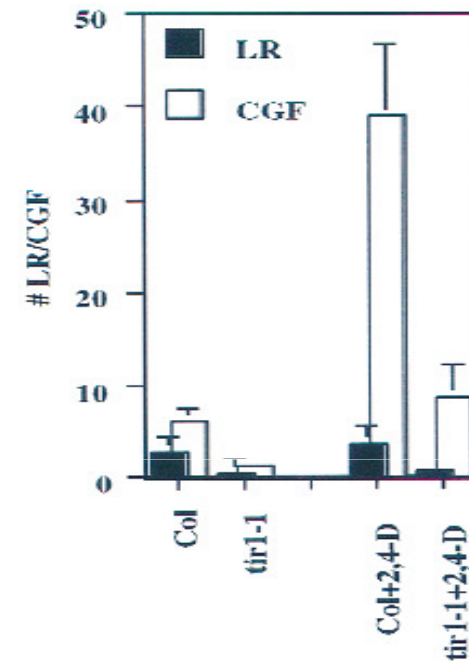
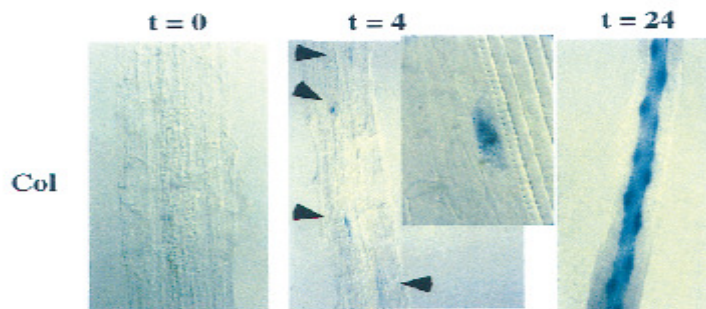
- Entwicklung lateraler Wurzeln → Hypothese: benötigt Auxin
- TIR1 wird in der lat. Wurzelentw. exprimiert



→ Hypothese bestätigt

TIR1 Funktionen in lateralen Wurzeln

- Test, ob TIR1 Entwicklung einleitet:
in *tir1-1* Mutanten *cycAt* Expression wird über *cycAt-gus* Reporter betrachtet
- Wenn Initiierung von LRs TIR1 abhängig erfolgt, ist eine reduzierte Anzahl von Primordien zu erwarten und weniger CGFs



Ergebnis:

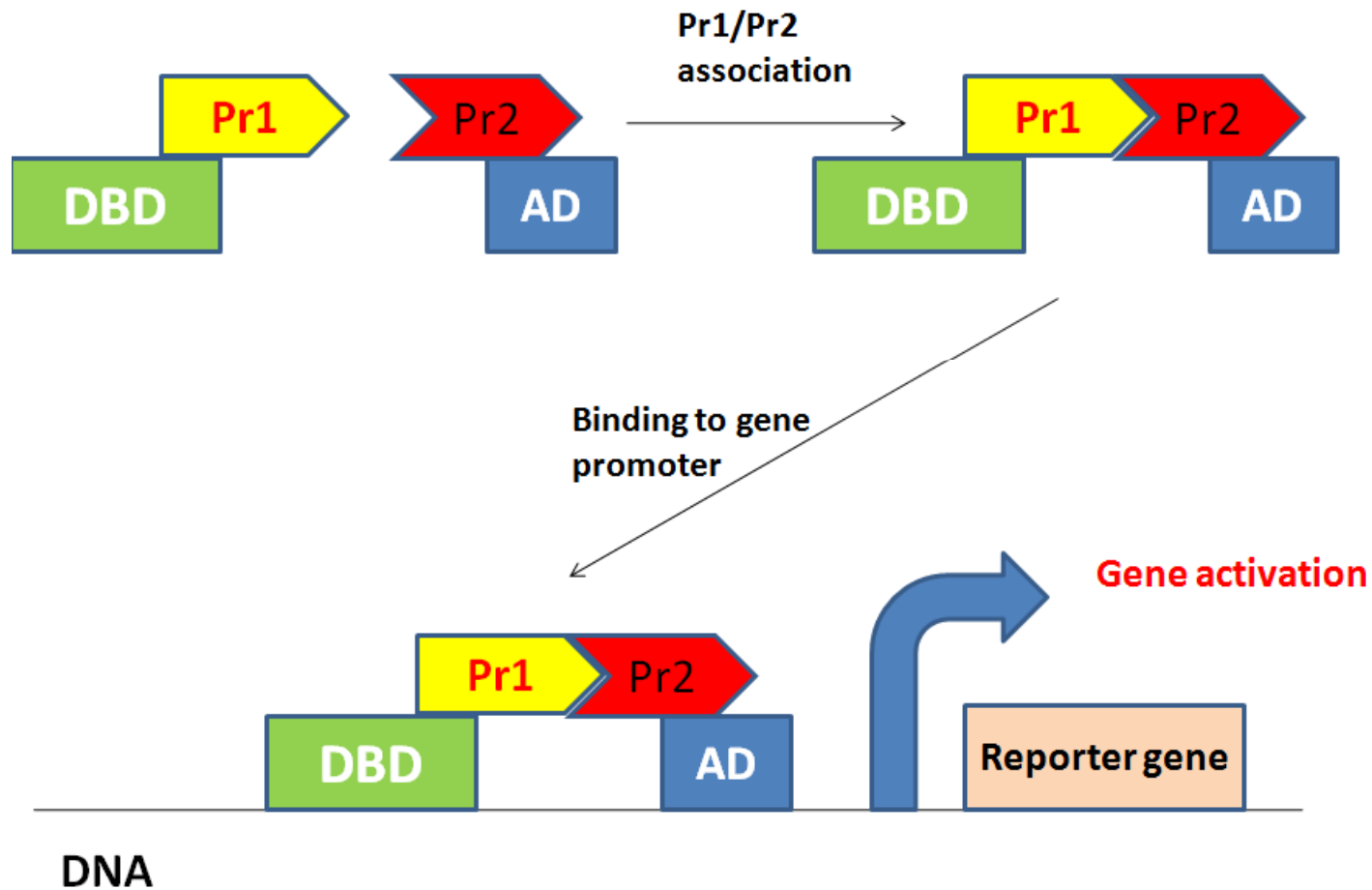
TIR1 wird für die *cycAt* Expression benötigt

TIR1 ist notwendig um in G2 Phase einzutreten

Proteine, die mit TIR1 interagieren

- **Yeast-two-Hybrid:** Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in Hefe
 - DBD-TIR1 als Köderprotein (bait) im Hefestamm YPB2
 - AD mit cDNAs von *A. thaliana* (*prey*)
- Screening der erstellten Expressionsbibliothek
 - 7×10^6 Transformanten → 61 Kandidaten identifiziert, davon 33 bestätigt
 - Einteilung in 2 Klassen

Proteine, die mit TIR1 interagieren

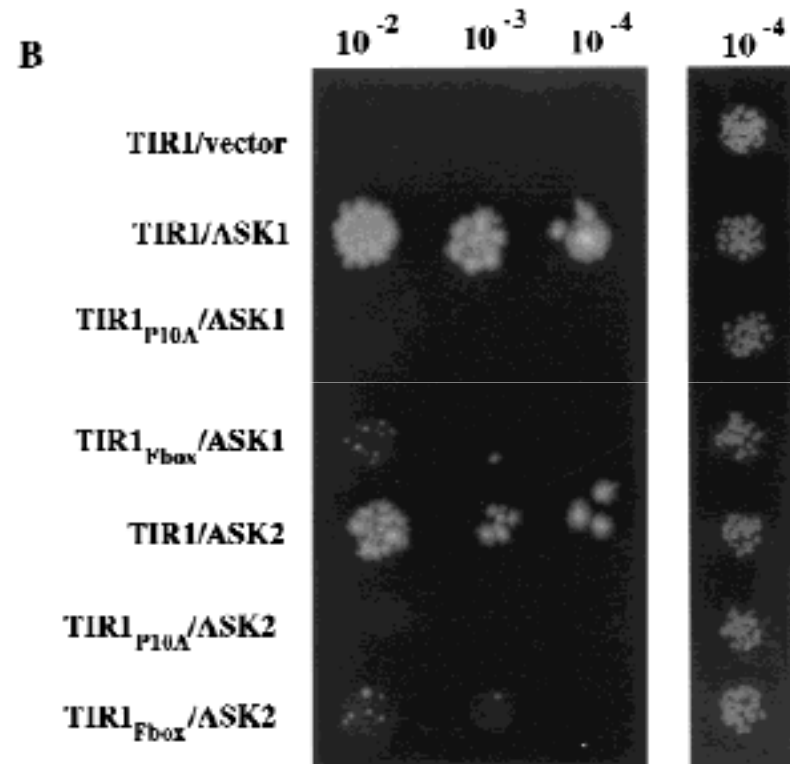


Proteine, die mit TIR1 interagieren

- Sequenzanalysen der 2 Klassen:
 - 1. Klasse identisch mit *Atskp1* Gen → umbenannt zu *ASK1*
 - 2. Klasse bezieht sich auf *ASK2* Gen
 - Homolog zu *SKP1* Gen in Arabidopsis (*ASK1*)
 - Es wurden noch 8 weitere Mitglieder dieser Genfamilie entdeckt (*ASK3* bis *ASK10*)
 - *ASK1* und *ASK2* haben die größte Ähnlichkeit untereinander

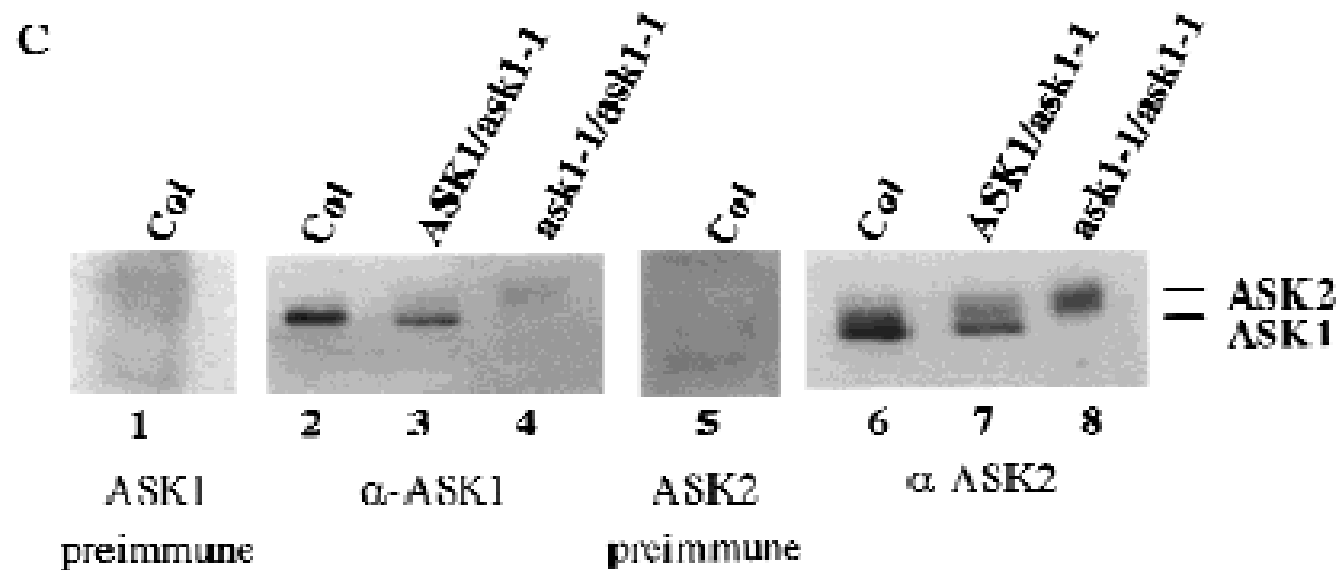
Interaktion mit TIR1

- Veränderung der F-Box Domäne von TIR1, hochkonserviertes Prolin (AS10) wird zu Alanin verändert → TIR1_{P10A}
- Die Mutation zerstört die Fähigkeit zur Interaktion
- Nur die F-Box reicht für eine Reaktion aus



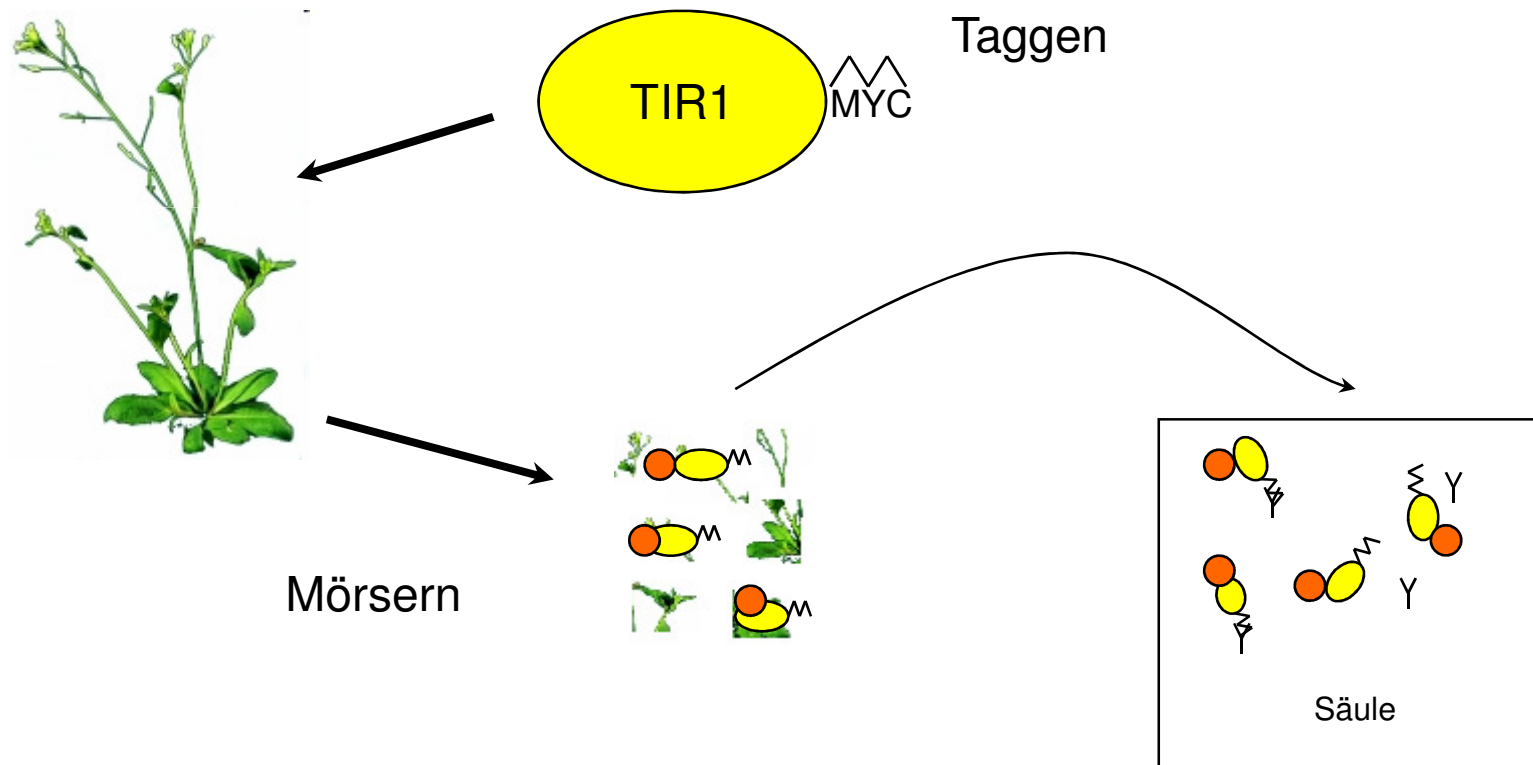
Bildet TIR1 SCF-Komplexe?

- Vorbereitung für die Immunpräzipitation:
Charakterisierung der Antikörper von ASK1
und ASK2






Immunpräzipitation

- Experiment zum Nachweis von Interaktionen zwischen TIR1(Protein) und ASK1 und ASK2



Immunpräzipitation

- Western Blot:

α -Myc	α -ASK1	α -ASK2
		

Spezialfall

Warum verwendeten die Forscher die tir1-1 Mutante, anstatt dem Wildtyp?

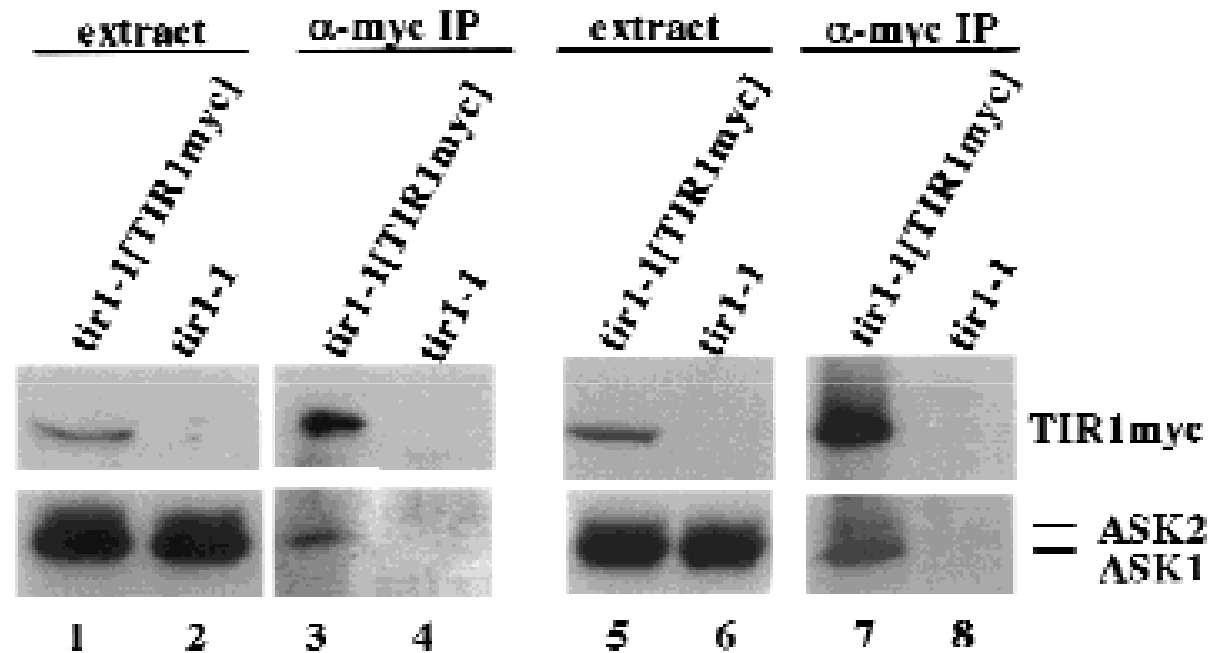
Antwort :

Da die tir1-1 Mutante kein funktionales TIR1 produziert, sind in der Pflanze lediglich intakte TIR1-MYC enthalten.

Es kommt zu keiner Konkurrenz zwischen dem getaggten und den ungetaggten TIR1.

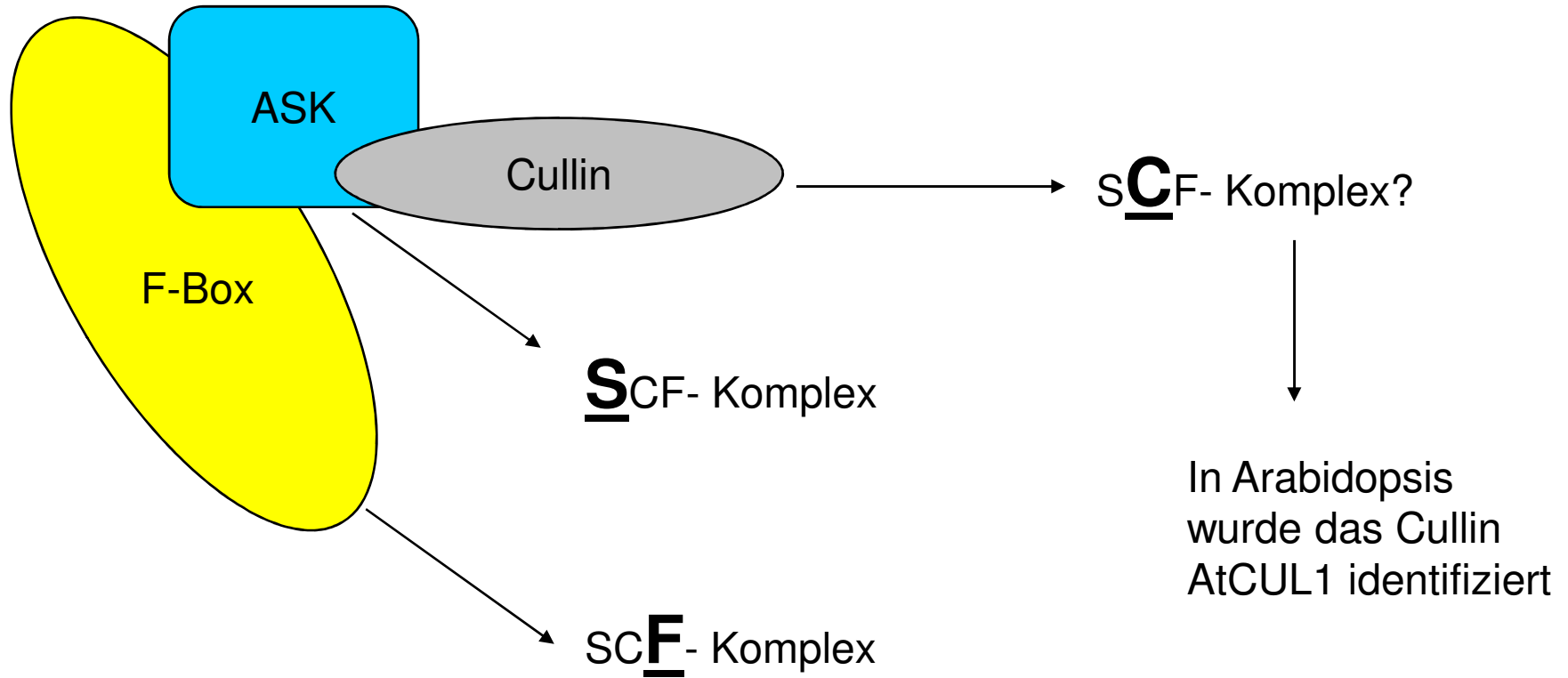
→ Pulldown ist effizienter

Co-IP Ergebnis

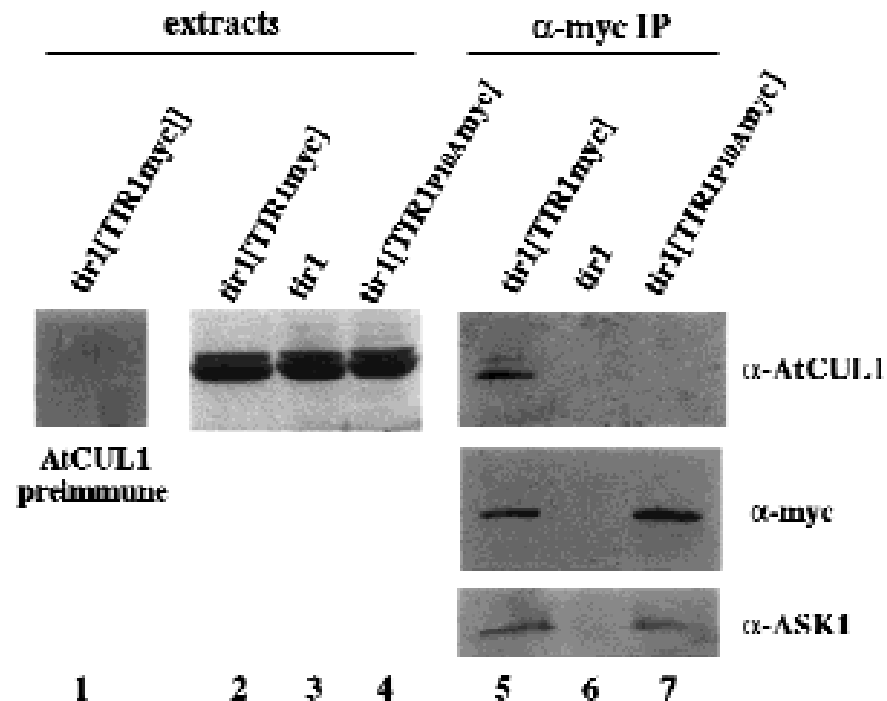


- Interaktion zwischen TIR1 und ASK1/2

E3



Bildet TIR1 SCF – Komplexe?

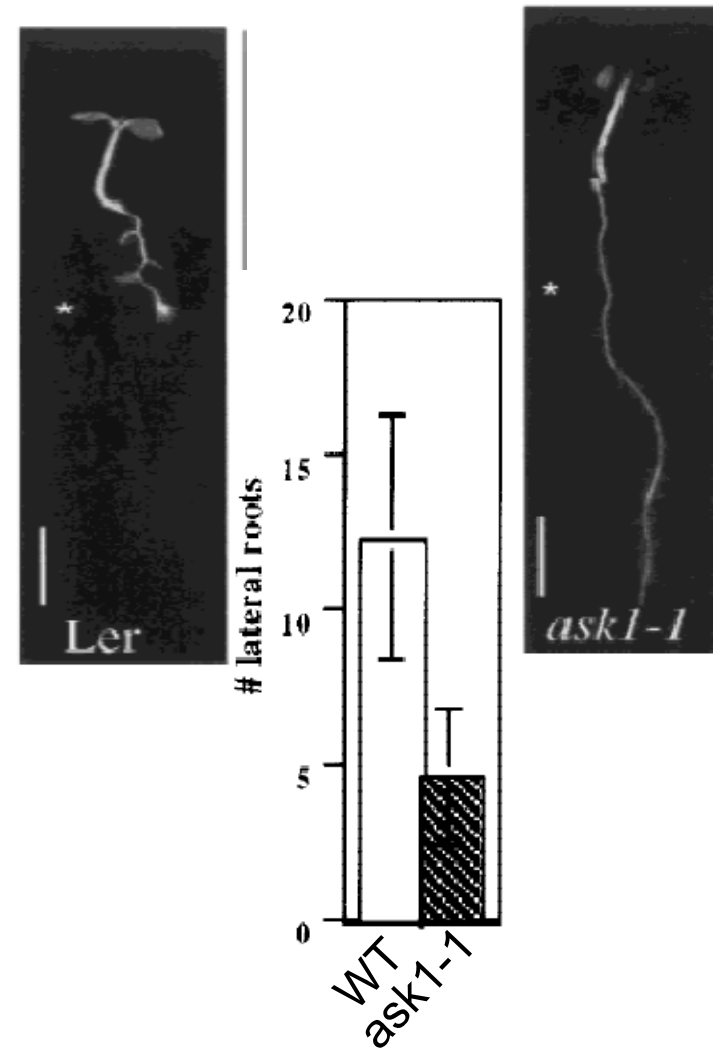


- Wirkungsweise von AtCUL1 mit TIR1 über Immunpräzipitation untersucht

Ergebnis zeigt: TIR1 ist im SCF-Komplex enthalten

ASK1

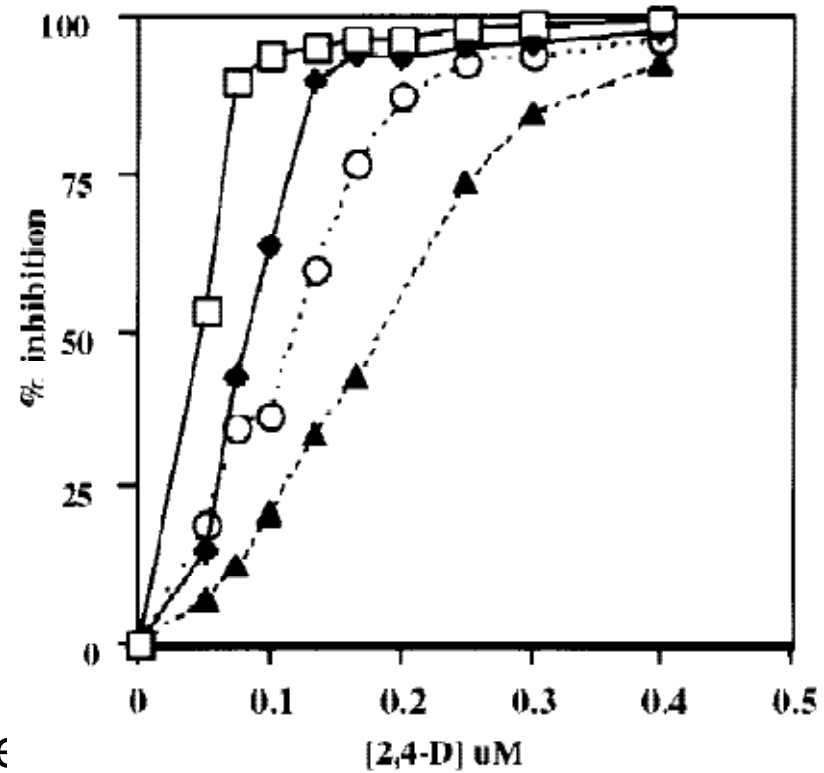
- ASK1 wird für Auxinantwort benötigt
- Isolierung einer *ask1-1* Mutante
- Pflanze erst ohne Auxin angezogen, dann auf Platte mit 2,4-D transferiert
- *ask1-1* Mutante: kaum lat. Wurzeln, resistent gegenüber Wurzelinhibierung



ASK1

Auxinresistenz im Phänotyp:

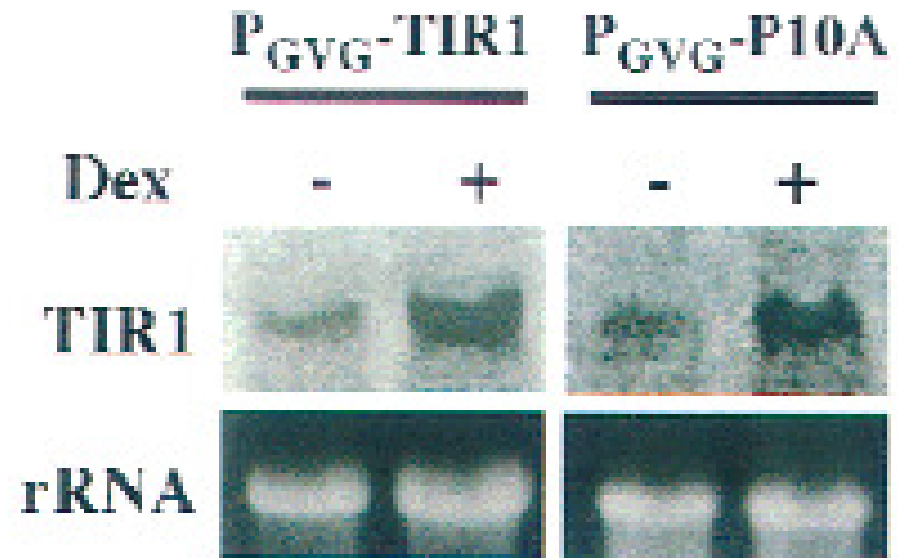
- Wildtyp
- ◆ *tir1-1*
- *ask1-1*
- ▲ *tir1-1, ask1-1*



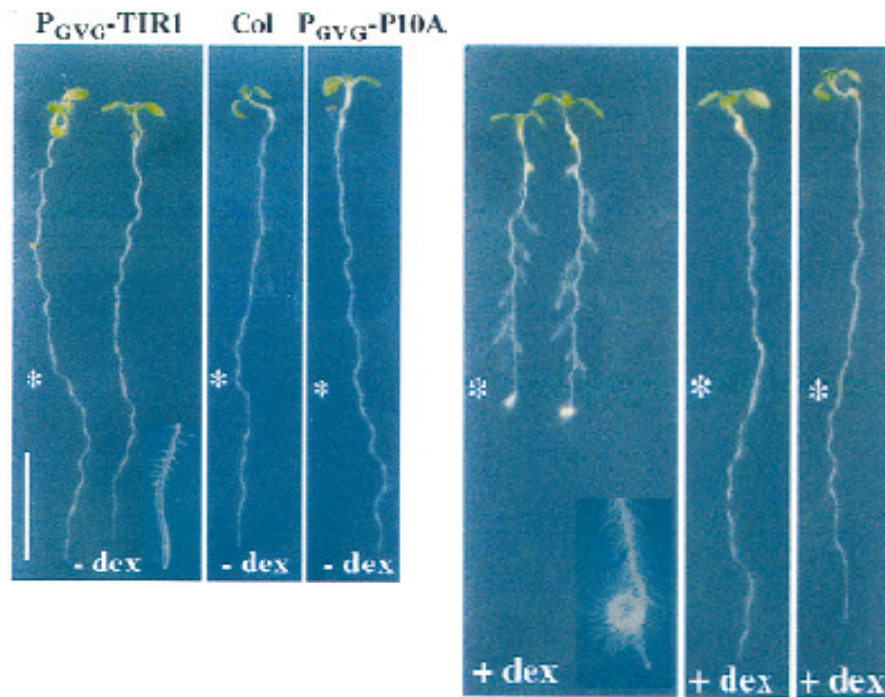
Experiment bestätigt genetische
Interaktion zwischen ASK1 und
TIR1

TIR1 Überexpression führt zur Auxinantwort

- Transformation: Glucocorticoid- induzierte TIR1 Expression
- Zugabe von Dexametason
→ Überexpression



Phänotyp im Licht



Zugabe von Dex.:

- Entwicklung lateraler Wurzeln
- „Root Points“

F-box Mutante verhält sich wie WT

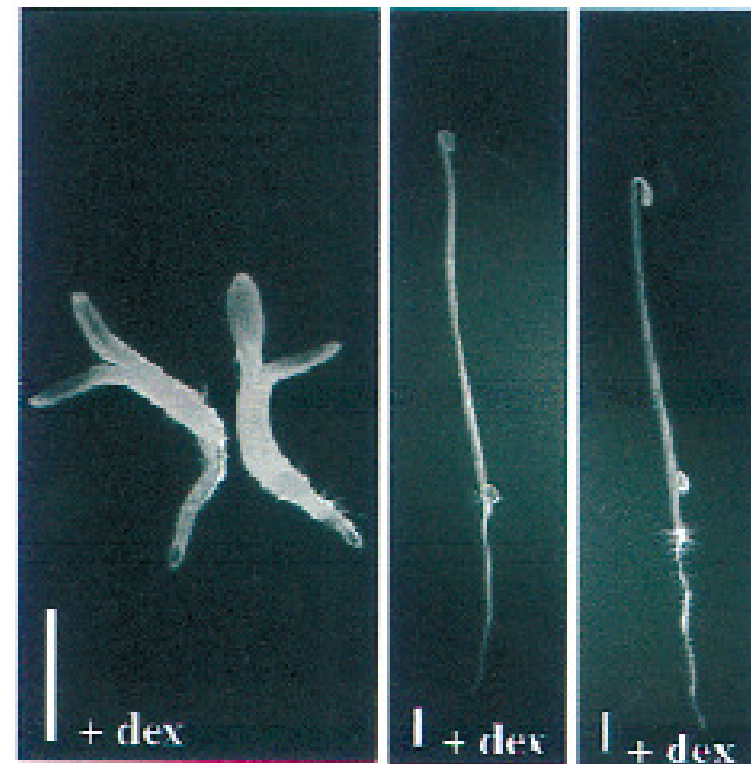
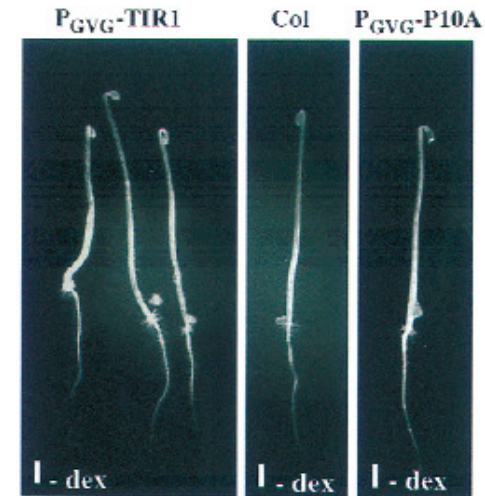
Bei Dunkelheit

WT und F-Box Mutante:

- Vergeilt, Elongation des Hypokotyls

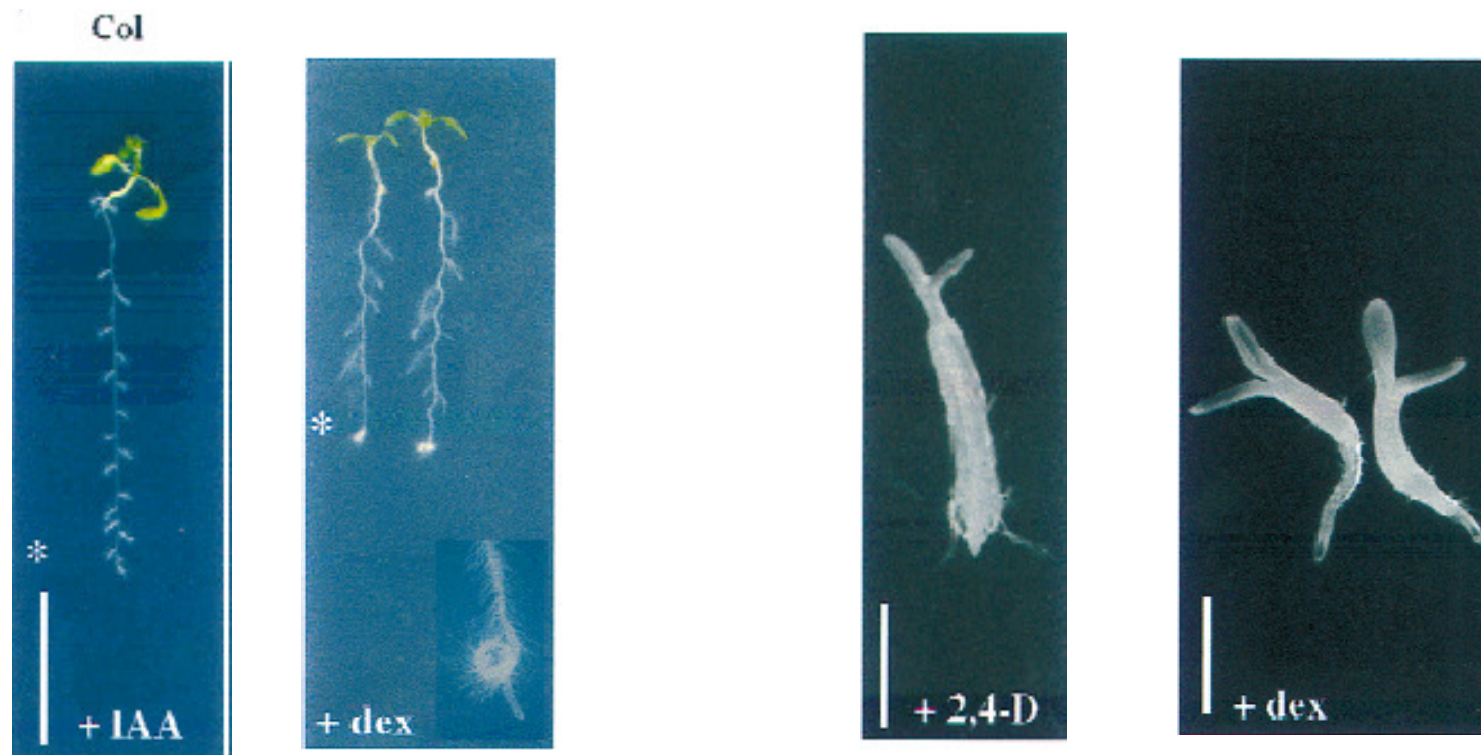
Überexpression von TIR1:

- Inhibiert Sprossachsenwachstum
- „deetiolation“



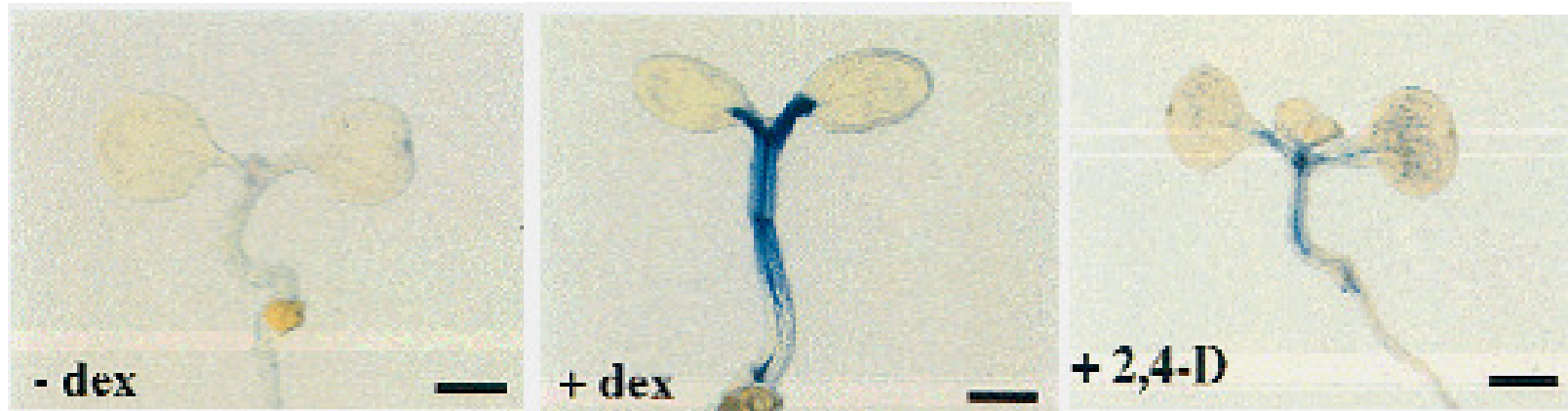
Auxinantwort

- TIR1 Überexpression ähnelt Auxinantwort



Mit Gus - Reporter

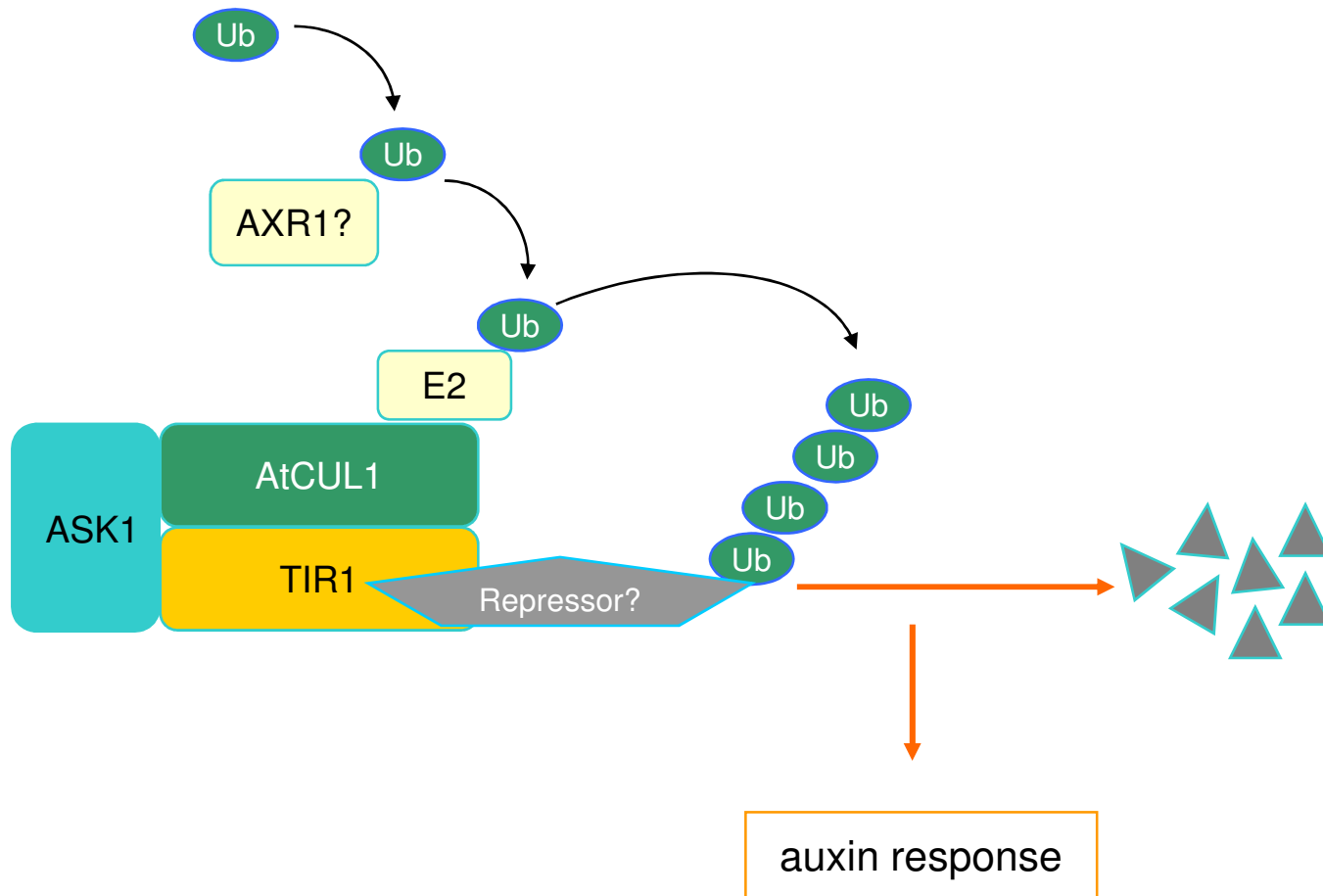
- Auxininduzierte pIAA4-gus Expression
→ gut sichtbar



Ergebnisse

- In Arabidopsis bilden ASK1 (ASK2) und AtCUL1 mit TIR1 einen SCF-Komplex genannt SCF^{TIR1}
(AtCUL1 wird von RUB modifiziert)
- SCF^{TIR1} Komplex lässt sich auch auf andere Pflanzen erweitern

Neues Modell



Nächstes Mal

Patrik / Marcus mit:

Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins

William M. Gray^{*†}, Stefan Kepinski^{†‡}, Dean Rouse^{‡§}, Ottoline Leyser[‡] & Mark Estelle^{*}

^{} The Institute for Cellular and Molecular Biology, The University of Texas at Austin, Austin, Texas 78712, USA*

[‡] Department of Biology, University of York, Box 373, York YO10 5YW, UK

[†] These authors contributed equally to the work